
MICROGREFFAGE DU SEQUOIA GÉANT

O. MONTEUUIS

Étude réalisée au Laboratoire de Phytomorphogenèse
U.A. 45 - C.N.R.S.

4, rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand Cedex

Class. Oxford 174.7 Sequoiadendron giganteum : 165.3

SOMMAIRE

1. introduction.	40
2. données préliminaires.	42
21 — greffage <i>in vivo</i>	42
22 — greffage <i>in vitro</i>	42
221 - conditions expérimentales	42
222 - commentaires	43
3. microgreffage de méristèmes.	47
31 — techniques de greffage.	47
32 — résultats et variantes expérimentales	48
321 - taille du greffon.	48
322 - stade végétatif du greffon	52
323 - vigueur du porte-greffe	52
324 - greffes sur épicotyle et sur hypocotyle.	53
325 - substances de croissance	53
33 — évolution des greffons.	54
4. discussion - conclusion	55
Bibliographie	58
Résumé.	61
Summary.	61
Zusammenfassung	61



1. introduction

La greffe végétale est une technique de multiplication végétative utilisée depuis bon nombre d'années sur diverses espèces, ligneuses ou herbacées (Hartmann et Kester, 1975, Champagnat, 1978). Le greffage d'un greffon, issu de la plante que l'on veut propager, sur un porte-greffe adapté permet entre autres :

- de multiplier (cloner) des végétaux considérés pour différents critères comme remarquables, mais demeurant récalcitrants au bouturage, généralement à cause de leur inaptitude à la rhizogenèse adventive; les exemples sont nombreux aussi bien chez les variétés fruitières que chez les cultivars ornementaux;
- de remédier à des conditions édaphiques défavorables, tant du point de vue physique (ancrage) que chimique (chlorose), grâce à l'appareil racinaire adapté du porte-greffe;
- de modifier le port originel de la plante greffée en atténuant généralement sa vigueur et en réduisant par là même les opérations de tailles (cas des vergers à hautes densités et de certaines formes ornementales);
- d'accélérer les délais de mise à fleur et, par suite, de hâter la fructification, que ce soit à des fins de production (arboriculture fruitière), ornementales, sylvicoles, ou de sélection génétique (vergers à graines);
- d'éviter les dégâts causés par certains agents pathogènes du sol.

Outre ces avantages reconnus et exploités de longue date, le greffage peut être un moyen de stimuler l'aptitude organogène de certains individus considérés intéressants, mais inaptes à la reproduction végétative (clonage) car matures, voire séniles. De ce point de vue, les travaux ou observations de Doorenbos (1953), Franclet (1977), Crézé (1984), Misson et Giot-Wirgot (1985), Monteuis (1985), Tran Van et David (1985), pour ne citer qu'eux, sont révélateurs. Ces auteurs ont en effet constaté que le greffage de rameaux issus de sujets âgés sur des porte-greffes jeunes et vigoureux favorise le phénomène de « retour en arrière » (Nozeran, 1978) ou « rajeunissement », par référence à certaines caractéristiques des formes de jeunesse appréciées par divers indices : morphologie foliaire, croissance, rhizogenèse adventive,... Cette possibilité paraît conditionnée par la taille du greffon qui gagnerait à être réduite (Nozeran 1978 et 1982, Watelet-Gonod et Favre 1981, Blethon 1984, Tran Van et David 1985) et augmente avec le nombre de transferts du greffon sur le jeune semis porte-greffe (Franclet 1977, De La Goublaye 1980, Murashige 1985, 1986). L'intérêt de ces greffages successifs serait de parvenir à une différenciation progressive de l'implant du fait de l'influence présumée rajeunissante du porte-greffe. Ce procédé de greffage en cascade, apparemment fructueux à terme, demeure néanmoins astreignant et lourd de mise en œuvre. De ce fait, la possibilité de greffer directement un méristème, théoriquement à l'abri du processus de différenciation affectant la plante lors de

son développement, paraît être une solution séduisante et avantageuse (Burger, 1984). Cet objectif nécessite une mise au point technique qu'il nous a paru intéressant d'exposer sur notre matériel d'étude : le sequoia géant — *Sequoiadendron giganteum* Buchholz — espèce retenue par l'Association Forêt-Cellulose pour ses potentialités sylvicoles.



Sequoia géant dans son aire naturelle en Californie (U.S.A)

2. données préliminaires

21 - GREFFAGE IN VIVO

Une étude des possibilités de clonage de sequoias géants centenaires (Monteuuis, 1985) permet de formuler les remarques suivantes :

- le greffage de ramets provenant d'individus âgés sur de jeunes porte-greffes de la même espèce favorise la réactivation organogène du greffon, provoquant notamment des réversions de la morphologie foliaire vers le type juvénile; ces manifestations sont plus ou moins marquées en fonction des clones;
- considérant cette référence morphologique significative, il semble que le rajeunissement causal présumé persiste d'autant plus longtemps au cours de la croissance du greffon que celui-ci a été greffé petit;
- dans nos conditions de serre horticole, des tentatives répétées afin de réduire la taille du greffon à des dimensions inférieures à 3-4 mm ont toutes avorté;
- toujours dans le même environnement non contrôlé (notamment du point de vue de la lumière et de la température), la technique du greffage en cascade (De La Goublaye, 1980) n'a pas abouti aux résultats escomptés en matière de « rajeunissement ».

Ces diverses raisons nous ont incités à opter pour le greffage *in vitro*.

22 - GREFFAGE IN VITRO

221 - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les porte-greffes, cultivés *in vitro* en conditions axéniques, sont obtenus au terme des étapes chronologiques suivantes.

Les graines, conservées en chambre froide (+ 1°C) ou stratifiées, sont immergées durant 24 heures dans une solution de bénomyl à 2 gl⁻¹ additionnée de quelques gouttes de mouillant « Tween 80 ». Après une désinfection de quatre à cinq minutes dans une solution d'éthanol à 50 %, puis dans du chlorure mercurique à 1°/‰, les graines sont abondamment rincées dans quatre bains d'eau distillée stérile, puis réparties aseptiquement, sous hotte à flux laminaire, dans des bocaux de culture de 0,5 l, garnis au tiers de leur hauteur de vermiculite imbibée d'eau distillée, l'ensemble ayant été préalablement stérilisé par autoclavage. Ces récipients, maintenus fermés par une bande de parafilm, sont ensuite disposés en chambre de culture où des tubes fluorescents « Mazda Fluor lumière du jour de luxe » assurent une intensité lumineuse de 10 W.m⁻² pendant 16 heures; la température est stabilisée à 23±1°C. Dans ces conditions, la germination s'effectue après un délai de deux à quatre semaines, la faculté germinative dépendant de l'origine des semences et de leur traitement préalable

(stratification). Au stade cotylédons étalés-émergence de l'épicotyle, les plantules sont repiquées individuellement dans des tubes de culture de 20 x 160 mm coiffés de façon non hermétique de capuchons en matière plastique transparente. Ces tubes contiennent un substrat qui peut être de diverses natures (voir ci-après), et dont la fonction première est d'assurer un bon développement de l'appareil racinaire de la plantule *in vitro*. Ce support physique est imbibé de la solution minérale de Murashige et Skoog (1962), additionnée de 30 gl⁻¹ de saccharose et ajustée à pH= 5,5 par une solution de KOH 0,1 M. L'ensemble a été autoclavé à 120°C pendant vingt minutes.

Dans ces conditions, la croissance du jeune semis repiqué est satisfaisante et le porte-greffe atteint bientôt une taille suffisante (épicotyle de 2 à 3 cm) pour permettre le greffage dans de bonnes conditions.

Les greffons sont des extrémités apicales d'axes végétatifs prélevés sur des clones centenaires de sequoia géant mobilisés par greffage et élevés en conteneurs (Monteuuis, 1985). Après une désinfection sommaire à l'éthanol, le greffon est excisé sous loupe binoculaire éclairée par un système de fibres optiques (« lampe froide ») pour atténuer les risques de dessèchement ou de brûlure des tissus. La base de l'explant est ensuite délicatement posée sur la section de l'axe principal du porte-greffe, selon une technique déjà éprouvée (Navarro *et al.* 1975, Shimomura et Fuzihara 1977, Jonard *et al.* 1983) à l'intérieur du tube de culture. Toutes ces manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire, dans un environnement stérile.

222 - COMMENTAIRES

La méthodologie et les techniques exposées appellent quelques commentaires.

- Certains lots de graines s'avèrent plus récalcitrants à la désinfection que d'autres : le principal agent pathogène, *Botrytis cinerea*, peut se manifester en cours de germination. Les éventuelles infections apparaissent généralement au niveau du point d'attache de la graine sur la bractée séminale. L'hypothèse de germes incrustés dans le tégument est tout à fait plausible et, dans ce cas, leur neutralisation par des anticryptogames risque d'altérer la capacité germinative des semences. De ce point de vue, la germination sur substrat stérile est avantageuse; la substitution de l'eau distillée par la solution nutritive utilisée pour l'élevage des porte-greffes n'a aucun effet bénéfique sur la levée, mais favorise en revanche la prolifération de contaminations éventuelles. Une autre solution pour obtenir des cultures de semis porte-greffes axéniques consiste à introduire *in vitro*, au stade cotylédons étalés, de jeunes plantules germées *in vivo*, en serre. Préalablement, ce matériel aura été désinfecté de la façon suivante : trempage cinq minutes dans de l'éthanol à 70 % suivi d'un bain de cinq minutes dans HgCl₂ à 1°/∞, puis de quatre rinçages copieux dans de l'eau distillée stérile.

- Le milieu nutritif indiqué a été adopté après un essai comparatif testant l'influence de quatre solutions minérales différentes (voir figure n° 1) sur la croissance des porte-greffes. Conjointement, nous avons pu établir que des teneurs en saccharose trop fortes (60 et 90 gl^{-1}) ou trop faibles (10 gl^{-1}) ralentissent le développement de semis sans améliorer significativement la réussite du greffage; la dose de 30 gl^{-1} de saccharose paraît la plus adaptée.

FIGURE N° 1

Hauteur moyenne de l'épicotyle des semis porte-greffes après cinq mois de culture in vitro sur les milieux nutritifs A, B, C, D suivants :

- A : milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné de 30 gl^{-1} de saccharose.
- B : les macroéléments du milieu A sont remplacés par ceux de Quoirin et Lepoivre (1977).
- C : les macroéléments du milieu A sont remplacés par ceux de Rancillac et al. (1982).
- D : les macroéléments du milieu A sont remplacés par ceux de Knop (cités par Augé et al. 1982).

Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ($p = 5\%$).

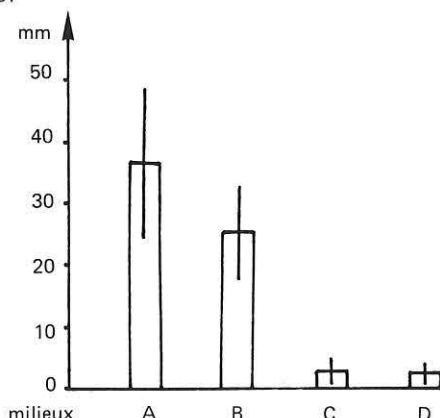


photo n° 1 : microgreffe de bourgeon d'individu centenaire; l'opération a été réalisée à l'intérieur du tube de culture, selon la technique exposée § 22, sur un jeune semis implanté dans de la vermiculite.

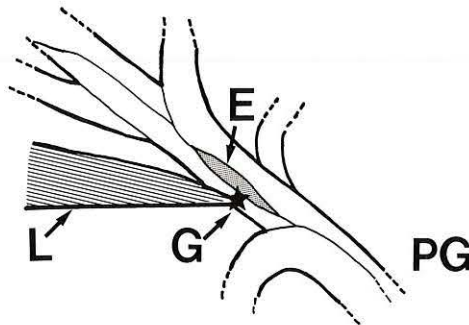
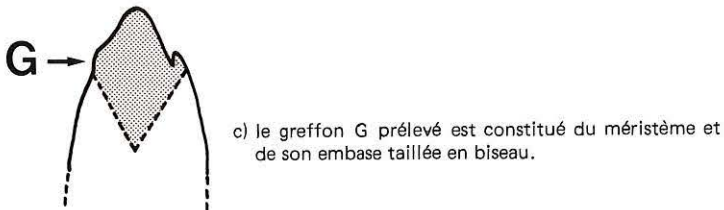
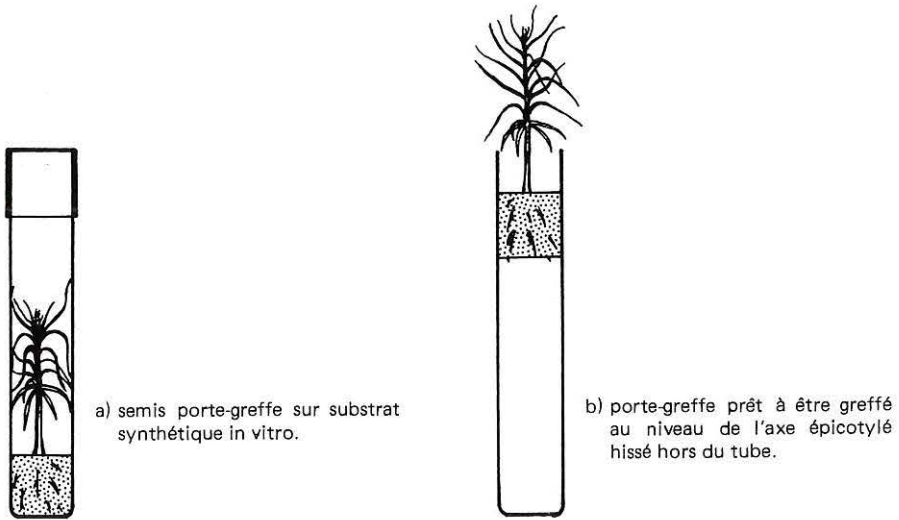
- Conscients de l'effet bénéfique de la qualité du système racinaire du porte-greffe sur la réussite du greffage, différents substrats horticoles ont été préférés à la texture gélosée. Cette option correspond également au souci de faciliter le repiquage et l'acclimatation ultérieure du vitroplant. Perlite fine (Crézé, 1984) et vermiculite donnent, de ce point de vue, entière satisfaction et permettent l'obtention de porte-greffes vigoureux. L'emploi de tourbe blonde est plus délicat : ce matériau nécessite généralement une double stérilisation et le contrôle de l'acidité du milieu demeure problématique, au même titre que le maintien d'un rapport phase liquide/phase gazeuse adapté (Rancillac *et al.* 1982).
- L'inconvénient majeur de ces différents types de substrats réside dans la nécessité de greffer sur le porte-greffe en place, autrement dit à l'intérieur du tube de culture. Cette solution, même lorsque le substrat remplit les trois quarts du tube, entrave les manipulations nécessaires et incite à opter

pour des techniques de greffage simples, généralement dérivées de la greffe anglaise, sommairement décrites précédemment (§ 221). Dans ces conditions, la reprise, puis l'allongement du greffon restent très aléatoires : la plupart des explants dépérissent après une période de latence plus ou moins longue. De plus, avec cette technique, toutes les tentatives destinées à réduire la taille du greffon à des dimensions inférieures à 1 mm, en ne conservant que les ébauches foliaires et les jeunes feuilles, se sont soldées par des échecs, l'apex se dessèchant rapidement.

- L'utilisation au niveau de la greffe de diverses substances de croissance : AIA et ANA : 0,01 à 0,5 mg.l⁻¹ (voir Shimomura et Fuzihara, 1977), BAP : 0,01 à 0,1 mg.l⁻¹, éventuellement associées à des solutions minérales ou du saccharose, sous forme gélosée ou en solution aqueuse (Jonard *et al.* 1983, Crézé, 1984), n'a aucun effet réellement probant.



FIGURE N° 2
Chronologie du microgreffage



d) le greffon G, situé sur l'extrémité de l'éclat de lame de rasoir L ayant servi au prélèvement, est inséré dans l'entaille E effectuée dans l'axe épicotylé du porte-greffe PG; l'opération terminée, le porte-greffe est replacé en conditions initiales (a).

3. microgreffage de méristèmes

31 - TECHNIQUE DE GREFFAGE

Les limites des techniques décrites précédemment apparaissent clairement : le greffage doit s'effectuer à l'intérieur du tube de culture, dans des conditions inconfortables ne permettant pas la véritable miniaturisation souhaitée de l'explant. L'avènement de blocs fibreux parallépipédiques ou cylindriques, en laine de roche ou en polypropylène, hydrophiles et chimiquement neutres, fut salutaire : leur utilisation permet d'extraire sans dommage l'ensemble substrat imbibé de solution nutritive + porte-greffe, afin que l'axe épicotylé dépasse du tube, facilitant ainsi les manipulations. L'épicotyle est alors incisé longitudinalement sur 1 à 2 mm à l'aide d'un éclat de lame de rasoir. L'opération suivante consiste à disséquer rapidement et soigneusement l'extrémité de la pousse végétative prélevée sur le clone centenaire pour ne conserver que le dôme méristématique avec ses primordia et, éventuellement, une ébauche foliaire. Cette structure est excisée par deux entailles basales en biseau. La dimension du greffon ainsi obtenu, plus haut que large, varie de 0,2 à 0,4 mm.

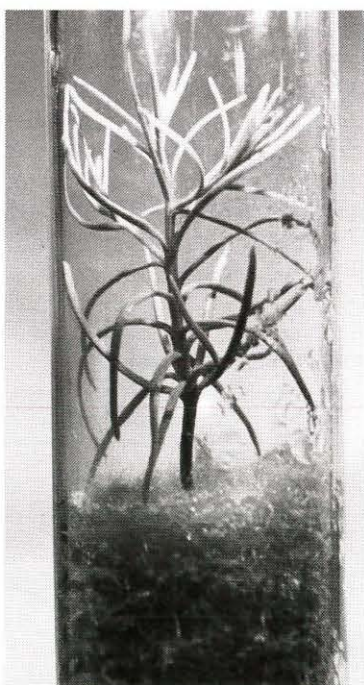


photo n° 2 : jeune semis porte-greffe, sur substrat fibreux, prêt à être greffé.

L'explant, posé sur l'extrémité de la lame de rasoir ayant servi à son prélèvement, est immédiatement et très délicatement inséré dans la fente effectuée sur le porte-greffe. Cette dernière étape s'apparente, toutes proportions gardées, à la technique de greffage traditionnelle dite « greffe en fente » et il importe de respecter les mêmes précautions : rapidité d'exécution, coupe franche, polarité du greffon, position correcte de l'implant afin de favoriser précocement l'adhérence entre greffon et porte-greffe. La greffe réalisée, le porte-greffe est replacé au fond du tube, dans les conditions de culture initiales.

Ces différentes manipulations sont illustrées par la figure n° 2 ci-contre. Il nous paraît important de rappeler que les opérations s'effectuent sous loupe binoculaire éclairée par une lumière froide pour éviter un dessèchement préjudiciable des tissus végétaux.

32 - RÉSULTATS ET VARIANTES EXPÉRIMENTALES

Cette technique a été appliquée à plusieurs lots de porte-greffes semblables; les greffons utilisés sont prélevés sur des pousses en repos végétatif de géotypes centenaires (Monteuuis, 1986). Sur un total de deux cents greffes réalisées et répertoriées, nous avons obtenu quatre-vingt un succès, soit 40,5 % de réussite, c'est-à-dire de greffons qui se sont allongés. La reprise, puis la croissance de la greffe, paraît conditionnée notamment par l'activité du porte-greffe qui peut être stimulée par l'addition, deux semaines avant le greffage, et en conditions stériles, de 1 à 2 ml de milieu nutritif liquide, la solution initiale pouvant s'évaporer en cours de culture. Dans les cas favorables, la soudure de l'implant s'effectue rapidement par prolifération des tissus corticaux du porte-greffe. Un sevrage progressif stimule le développement ultérieur du greffon.

Ces résultats établis, il nous a paru souhaitable de tester l'influence de certains paramètres expérimentaux sur la méthode de greffage proposée.

321 - TAILLE DU GREFFON

Comme on le conçoit aisément, la taille du greffon est un facteur limitant fonction de la technique de greffage adoptée, du matériel végétal étudié, et du manipulateur. Dans les conditions précisées, nous avons comparé la greffe d'apex, c'est-à-dire le méristème entouré de deux à quatre ébauches foliaires non chlorophylliennes, à la greffe de méristème proprement dit limité au dôme méristématique avec, éventuellement, un primordium foliaire. Les greffons correspondants mesurent respectivement 0,4 à 0,5 mm et 0,2 à 0,3 mm. Le tableau n° 1 confronte les deux variantes : on constate que la greffe de méristème, bien que techniquement réalisable grâce à la méthode mise au point, est néanmoins plus délicate à réussir que la greffe d'apex, ces derniers se montrant rapidement plus vigoureux et moins sujets aux phénomènes de dessèchement affectant la plupart des méristèmes greffés. Cette différence était prévisible (Navarro *et al.* 1975, Colin et Verhoyen 1976, Crézé 1984, Tran Van et David 1985).

TABLEAU N° 1
Influence de la taille du greffon sur le pourcentage de réussite au greffage

Nature du greffon	Résultats	% de réussite
Méristème* (greffon de 0,2 à 0,3 mm)	7/31	23 %
Apex** (greffon de 0,4 à 0,5 mm)	19/31	61 %

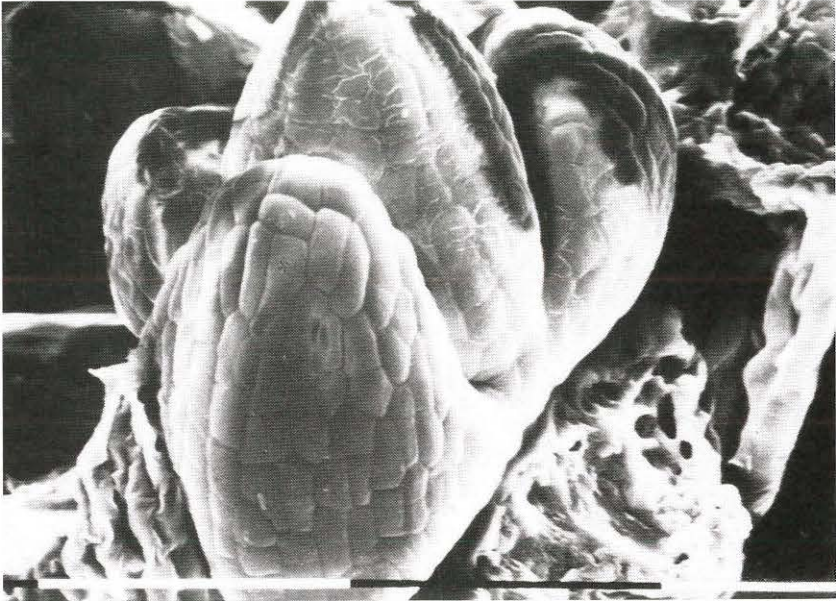
* : dôme méristématique avec, au plus, un primordium foliaire,

** : méristème (*) entouré de deux à quatre ébauches foliaires.

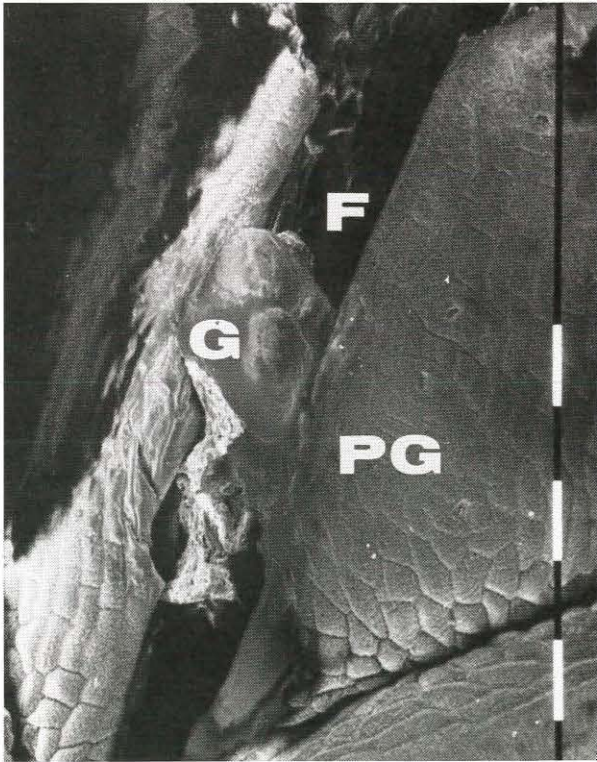
Les résultats sont exprimés en proportion de greffons organogènes par rapport au total des greffes effectuées; le traitement est significatif ($\chi^2 = 9,54$; $1^\circ/\infty < p < 1\%$).

PLANCHE I

Greffage de « méristèmes » (sens large) de *Sequoiadendron giganteum* centenaires sur de jeunes semis *in vitro* de la même espèce

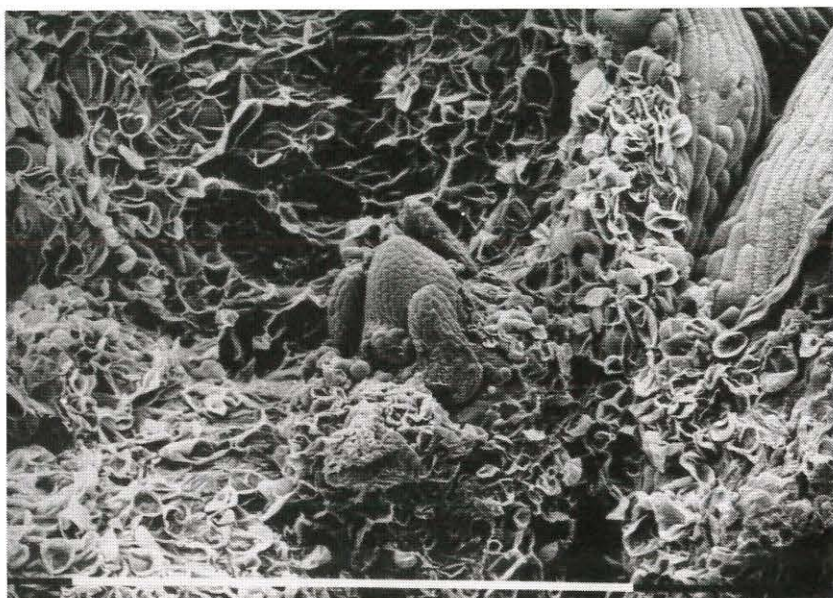


A : méristème de clone centenaire entouré d'ébauches foliaires, avant prélèvement.

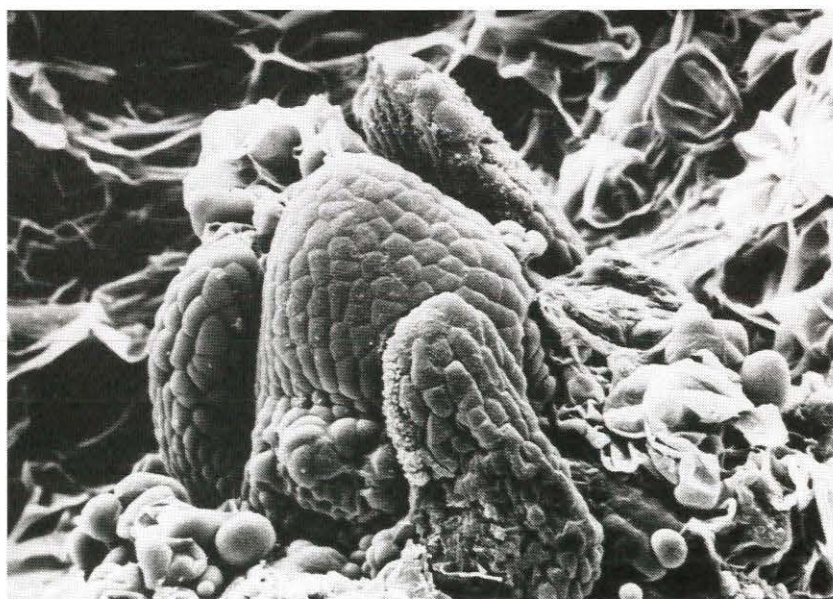


B : greffon (G) quelques instants après l'implantation dans la fente longitudinale (F) réalisée dans l'épicotyle du jeune semis porte-greffe (PG).

Greffage de « méristèmes » (sens
centenaires sur de jeunes se



C : greffon entouré de tissus proliférants du porte-greffe au niveau de la fente initiale dans laquelle l'implant a été préalablement inséré.

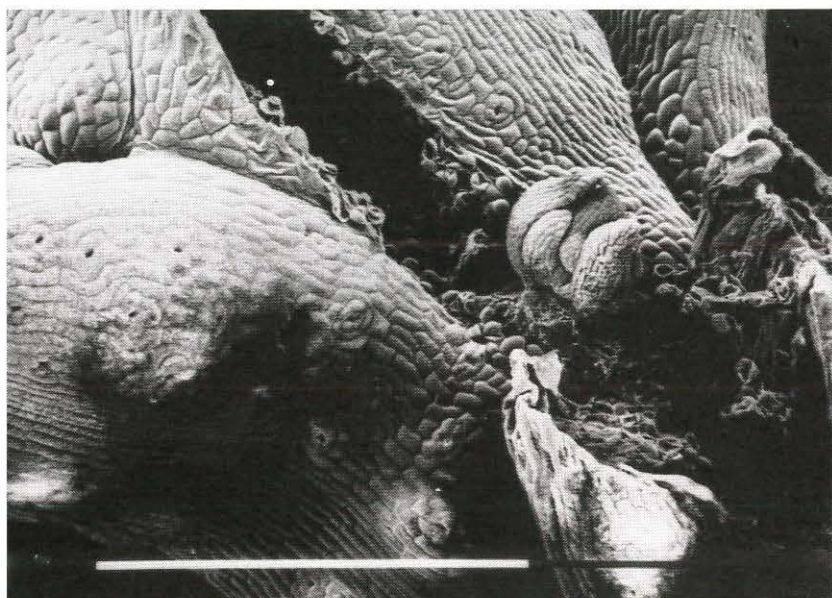


D : gros plan de la greffe réussie quelques jours après le greffage; on notera que la plupart des nombreuses vésicules à la surface des tissus proliférants ont éclaté lors de la préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique à balayage.

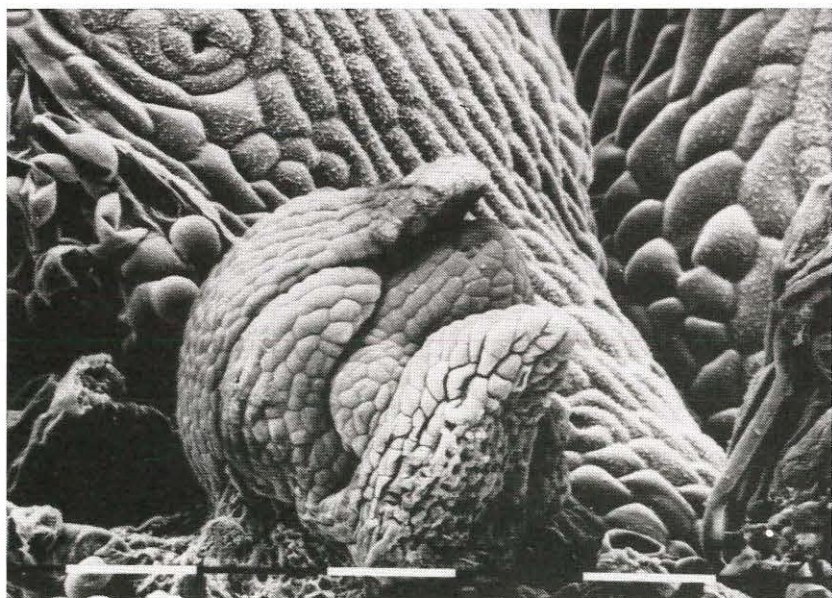
*Nous remercions Madame Says-Lesage et Monsieur Bodet du laboratoire de bioclimato
en microscopie électronique à balayage. Les indices unitaires sur les bords des photos*

CHE II

large) de *Sequoiadendron giganteum*
mis *in vitro* de la même espèce



E : début d'organogenèse du greffon soudé au porte-greffe; on aperçoit des stomates et l'insertion des feuilles au niveau de l'axe épicotylé du porte-greffe.



F : premiers stades de la phylogenèse du méristème greffé.

logie de l'INRA de Crouelle (63100 Clermont-Ferrand) pour la réalisation de ces clichés
représentent chacun 100 μ m pour les clichés A, B, D, F et 1 mm pour les clichés C et E.

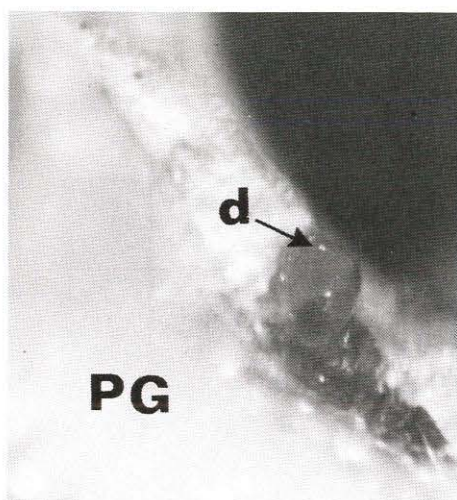


photo n° 3 : greffe de méristème (premiers stades de la reprise); on distingue le dome méristématique (d) du greffon inséré dans le porte-greffe (PG).



photo n° 4 : allongement du greffon.

322 - STADE VÉGÉTATIF DU GREFFON

Eu égard à l'importance, au moment du greffage, de l'état physiologique du greffon sur la réussite de la greffe (Jonard *et al.* 1983, Crézé 1984), nous avons distingué les implants prélevés sur des axes en repos végétatif apparent (bourgeon fermé), de ceux issus d'axes en cours de croissance. Les résultats correspondants du tableau n° 2 indiquent que, conformément aux premiers essais réalisés (Monteuuis, 1986), il est plus avantageux d'utiliser des méristèmes provenant de rameaux en arrêt de végétation, surtout lorsque les porte-greffes correspondants ne sont pas tous au stade le plus favorable de « montée de sève ».

TABLEAU N° 2

Influence du stade végétatif du greffon sur le pourcentage de réussite au greffage

État végétatif du greffon	Résultats	% de réussite
Repos.	16/31	52 %
Poussant	8/31	26 %

Les résultats sont exprimés en proportion de greffons organogènes par rapport au total de greffes effectuées; le traitement est significatif ($\chi^2 = 4,49$; $2\% < p < 5\%$).

323 - VIGUEUR DU PORTE-GREFFE

L'influence de la vigueur du porte-greffe sur le succès du microgreffage a été analysée sur deux lots de semis ne se différenciant que par la hauteur moyenne de l'axe épicotylé : 3,5 cm pour l'un des lots, 1,9 cm pour l'autre lot. L'examen des résultats incite à greffer sur des porte-greffes

vigoureux qui stimulent la reprise (voir tableau n° 3) et, surtout, la croissance ultérieure des greffons.

TABLEAU N° 3
Influence de la hauteur du porte-greffe sur le pourcentage de réussite au greffage

Hauteur de l'épicotyle	Résultats	% de réussite
19 (± 2) mm	17/23	74 %
35 (± 4) mm	13/24	54 %

Les résultats sont exprimés en proportion de greffons organogènes par rapport au total de greffes effectuées; le traitement n'est pas significatif ($\chi^2 = 1,95$; 5 % < p).

324 - GREFFES SUR ÉPICOTYLE ET SUR HYPOCOTYLE

Selon les espèces, il peut être conseillé de greffer au niveau de l'hypocotyle (Chimot-Schall, 1985). Dans notre cas, cette variante expérimentale est à proscrire au profit du greffage défini précédemment, sur l'axe épicotylé feuillé, au-dessus des cotylédons. Le tableau n° 4 rend compte des avortements causés par des difficultés d'union entre l'implant et le porte-greffe au niveau de l'hypocotyle, vraisemblablement imputables à des différences de nature histologique.

TABLEAU N° 4
Influence du greffage au niveau de l'épicotyle et de l'hypocotyle sur le pourcentage de réussite des greffes

Niveau de greffage	Résultats	% de réussite
• hypocotyle.	5/24	21 %
• épicotyle.	13/24	54 %

Les résultats sont exprimés en proportion de greffons organogènes par rapport au total de greffes effectuées. Le traitement est significatif ($\chi^2 = 5,68$; 1 % < p < 2 %).

325 - SUBSTANCES DE CROISSANCE

Nous avons testé, sur notre technique de greffage, divers traitements basés sur l'utilisation de substances de croissance exogènes : prétraitement des méristèmes (Jonard *et al.* 1983, Chimot-Schall, 1985) sur un milieu d'initiation adapté contenant 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA, application d'une solution de 0,1 mg/l d'ANA sur les tissus en contact des deux partenaires (Shimomura et Fuzihara, 1977), addition de 0,1 à 0,5 mg.l⁻¹ d'ANA dans le milieu de culture du porte-greffes (Chimot-Schall, 1985), éventuellement en association avec 0,1 mg.l⁻¹ de BAP. Par comparaison aux témoins,

ces différentes variantes expérimentales ont un effet négatif : les substances de synthèse utilisées provoquent des blocages de croissance et des phénomènes de dégénérescence différée des greffons; incorporées dans le milieu de culture des porte-greffes, elles nuisent à la qualité de ceux-ci (hypolignification, cals racinaires, hypertrophie de la partie caulinare), compromettant les sorties de tubes et acclimatations ultérieures.

33 - ÉVOLUTION DES GREFFONS

L'examen au cours du temps des greffes réussies révèle une certaine hétérogénéité quant à la reprise de croissance du greffon, sa vigueur et sa morphologie. Considérant plus particulièrement ce dernier aspect, nous constatons que le greffage d'un clone âgé, réduit à son méristème, peut provoquer une réversion vers le type morphologique juvénile (développement plus important des feuilles), auquel il s'identifie tout à fait dans certains cas en conditions de culture *in vitro* (voir photos n° 5, 6 et 7).

Ce «rajeunissement» s'exprime plus ou moins nettement au cours du développement en fonction des clones ou au sein d'un même clone, la variabilité morphologique intraclonale pouvant être assez prononcée. La sortie du tube et l'acclimatation aux conditions *in vivo* peut provoquer une atténuation de l'aspect morphologique juvénile des feuilles formées dans ce nouvel environnement plus naturel. L'organogenèse s'exprime également par l'apparition de bourgeons plus ou moins nombreux facilitant la réacquisition d'un port orthotrope initialement compromis par le greffage en position latérale.

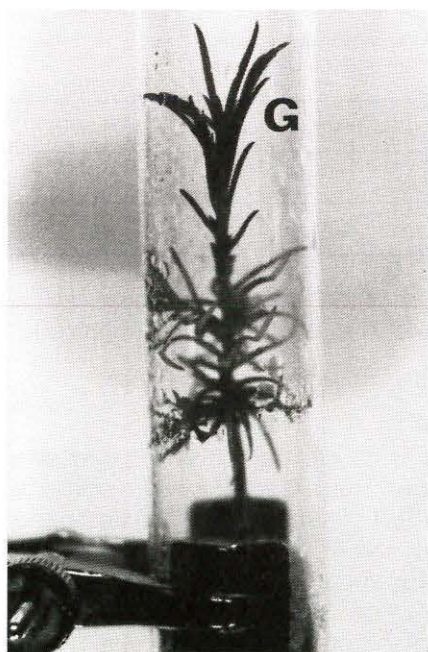


photo n° 5

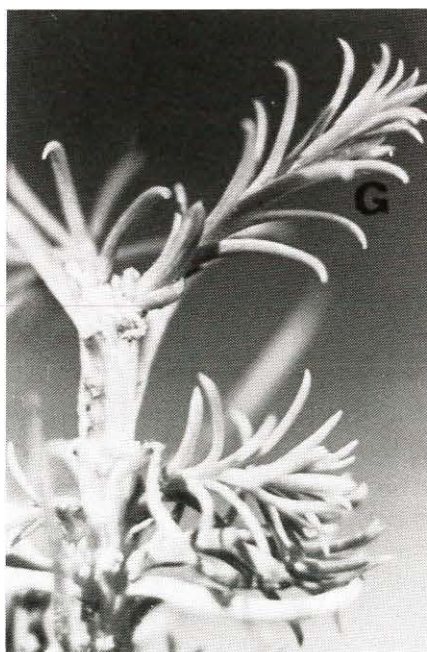


photo n° 6

Greffes issues de méristèmes de clone centenaire; la morphologie foliaire de type juvénile du greffon (G) est tout à fait remarquable.

4. discussion - conclusion

La mise au point de la technique de microgreffage exposée a abouti au terme du cheminement expérimental décrit. Nous avons pu constater, à cette occasion, que plusieurs procédés favorables à certaines espèces (*Citrus*, *Prunus*) ne conviennent pas au sequoia géant, confirmant la nécessité d'une expérimentation préalable sur le matériel végétal retenu. La dextérité manuelle du manipulateur, renforcée par une pratique fréquente, intervient également pour beaucoup dans la réussite du microgreffage (Murashige *et al.* 1972, Navarro *et al.* 1975). De ce point de vue, la possibilité de pouvoir hisser le porte-greffe hors du tube grâce à son support de culture synthétique est un avantage certain, facilitant et améliorant la précision et la qualité des gestes pour le plus grand profit de l'opération. Ces conditions privilégiées par rapport au greffage à l'intérieur du tube de culture, ou dans d'autres situations incompatibles avec un bon développement du système racinaire du porte-greffe (Jonard *et al.* 1983, Chimot-Schall, 1985), ont permis de pratiquer le greffage en fente latérale, favorisant la soudure et la reprise du greffon en évitant que celui-ci ne se dessèche.

Le microgreffage permet, quel que soit l'âge de l'ortet sur lequel est prélevé le greffon, d'unir des tissus jeunes et d'éviter, de ce fait, d'éventuels phénomènes d'incompatibilité locale liés aux différences d'ordre histologique entre les deux partenaires (Lachaud 1966, 1975) : nous n'avons, en effet, observé aucune différence significative de reprise en liaison avec l'âge des clones greffés. De plus, il est tout à fait probable que la qualité de la

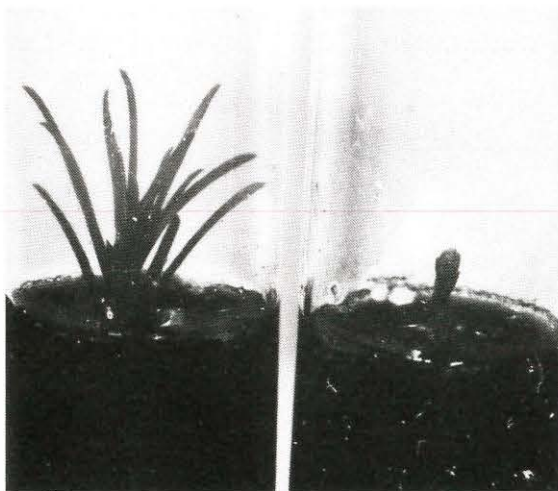


photo n° 7 : clone centenaire en introduction primaire *in vitro* : l'explant de gauche provient d'une microgreffe de méristème du même clone morphologiquement rajeuni.



photos n° 8 : acclimatation sur caisson de brouillard nutritif de microgreffe de clone centenaire; la morphologie du greffon s'identifie au type juvénile.

soudure, donc de la greffe, soit supérieure aux résultats obtenus par les méthodes de greffage usuelles. Il n'en demeure pas moins vrai, comme nous l'avons signalé, qu'une certaine hétérogénéité subsiste à l'intérieur d'un même clone issu de microgreffes. Le polymorphisme intraclonal des greffons, notamment, reflète, toujours par référence au type morphologique juvénile, différents degrés de rajeunissement. L'amplitude du phénomène peut avoir plusieurs causes :

- l'origine des clones : les analogies morphologiques avec les formes juvéniles paraissent plus ou moins marquées selon les clones issus de têtes de clone *in situ* de même âge;
- la localisation du méristème sur la plante-mère, correspondant à un état physiologique bien particulier sous la dépendance d'effets d'ordre corrélatif (Watelet-Gonod et Favre 1981, Nozeran 1982);
- la qualité des manipulations (excision, puis implantation);
- l'hétérogénéité de la population de semis porte-greffes utilisés susceptible d'influer sur la qualité de la greffe et de moduler l'«effet rajeunissant» en fonction des caractéristiques individuelles de chaque porte-greffe : pour Doorenbos (1953) et Murashige (1985, communication personnelle), ce sont surtout les feuilles des porte-greffes juvéniles qui favorisent le rajeunissement du greffon, bien que plusieurs références (Franclet 1977, Franclet *et al.* 1980, Wareing 1980, Nozeran *et al.* 1982, Monteuis 1985) mentionnent l'effet bénéfique de l'appareil racinaire.

La variabilité morphologique constatée évolue également avec la croissance du greffon au cours du temps et en fonction des phases de culture. Ainsi, l'acclimatation des formes morphologiquement rajeunies aux conditions *in vivo* s'accompagne parfois d'une réversion vers le type morphologique mature, alors que les sorties de tube réalisées sur caisson de brouillard nutritif diffèrent ces changements de phases indésirables (photos n° 8). L'influence de l'environnement est vraisemblablement à l'origine de ces modifications de comportement des méristèmes édificateurs (Franclet *et al.* 1980, Nozeran *et al.* 1982).

L'état actuel de nos observations nous incite à penser que le microgreffage de méristèmes favorise la réacquisition de caractéristiques juvéniles, du moins sur notre matériel d'étude (voir photos n° 5 à 9). Cependant, l'hétérogénéité constatée et, dans certains cas, la fugacité des manifestations sont autant d'indices qui traduisent les nuances et la complexité du phénomène. En raison des paramètres expérimentaux préalablement évoqués et des limites techniques de réalisation, le rajeunissement obtenu à l'aide d'un microgreffage de méristème ne semble pas aussi probant que dans le cas de régénération à partir d'embryons. Sur ce point Murashige *et al.* (1972), Navarro *et al.*, (1975) et Lutz (1984, communication personnelle) sont unanimes : sur *Citrus*, ces auteurs préfèrent le microgreffage à l'embryogenèse nucellaire afin d'éviter la phase juvénile indésirable liée à cette dernière technique. Sur le plan pratique, en ce qui nous concerne, l'intérêt du rajeunissement obtenu à partir d'un méristème greffé, ce rajeunissement ne serait-il que partiel, réside dans la possibilité d'améliorer le clonage d'arbres âgés sélectionnés. Nos travaux se poursuivent dans cet objectif. D'un point de vue fondamental, les phénomènes observés, basés essentiellement sur des références morphologiques, méritent d'être analysés de façon approfondie. Dans ce but, l'utilisation de nouveaux marqueurs judicieusement choisis, bien spécifiques du rajeunissement, paraît actuellement nécessaire.

Si le microgreffage semble une solution prometteuse pour faciliter le clonage d'«arbres plus» peu réactifs sur le plan de la multiplication végétative, ce type de manipulations peut également être mis à profit dans d'autres secteurs d'activité. En effet, à la plupart des attraits reconnus et préservés de la culture des méristèmes, s'ajoutent les avantages de la greffe, sommairement exposés en introduction. La technique de greffage décrite, applicable dans son principe à bon nombre d'espèces végétales, peut intéresser — par exemple — les domaines suivants :

- phytopathologie : le microgreffage est un moyen thérapeutique pour éliminer les viroses, comme l'attestent de nombreux travaux (Burger, 1984);
- étude des différents types d'incompatibilité (voir les recherches de l'équipe du professeur Jonard);
- étude des phénomènes de corrélation et, notamment, de l'influence des tissus ou structures situées dans le voisinage immédiat du méristème sur le développement de celui-ci (Champagnat, 1978);

- analyse de l'influence du porte-greffe sur le devenir du greffon, afin d'élucider bon nombre d'observations, toutes aussi suprenantes que révélatrices, telles que « l'effet rajeunissant », constaté du point de vue morphologique.



photo n° 9 : greffe acclimatée issue d'un méristème de sujet centenaire; le greffon (G) est rajeuni (au centre : témoin tire-sève du semis porte-greffe).

BIBLIOGRAPHIE

- AUGÉ R., BEAUCHESNE G., BOCCON-GIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., MINIER R., MORAND J.C., OUDIN Y., VIDALIE H. (1982)
« La culture *in vitro* et ses applications horticoles »
Lavoisier, Paris, 152 p.
- BLETHON J. (1984)
« Étude de la greffe des résineux »
Forêt Privée, 159, 95-105
- BURGER D.W. (1984)
« Micrografting : a tool for the plant propagator »
The international plant propagator's society, 34, 244-248
- CHAMPAGNAT P. (1978)
« Exposé sur les greffes. La greffe chez les végétaux »
Académie des Sciences, Séance du 9 octobre 1978, 40 p.

- CHIMOT-SCHALL P. (1985)
 «Analyse à l'aide des techniques de culture *in vitro* des mécanismes de l'incompatibilité au greffage du type localisé chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.).
 Thèse 3^{ème} cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 134 p.
- COLIN J., VERHOYEN M. (1976)
 «Micrografts with meristematic tissues, a possible technique to eliminate viruses from *Prunus* trees»
Acta Horticulturae 67, 97-102
- CREZE J. (1984)
 «Où en sommes-nous de la greffe d'apex de camélia ?»
Jardins de France, mars 1984, 104-105.
- DE LA GOUBLAYE DE NANTOIS T. (1980)
 «Rajeunissement chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) en vue de la propagation végétative. Études sur la plagiotropie des parties aériennes et racinaires»
D.E.A. Université de Paris VI, 44 p.
- DOORENBOS J., (1953)
 «Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations»
Preb 115, Wageningen, 28 nov. 1953, 98-102
- FRANCLÉ A. (1977)
 «Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures»
Afocel, Études et Recherches, 8, 12/77, 20 p.
- FRANCLÉ A., DAVID A., DAVID H., BOULAY M. (1980)
 «Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristèmes primaires caulinaires de pin maritime âgé (*Pinus pinaster* sol)»
C.R. Acad. Sc. 290, 927-930
- HARTMANN H.T., KESTER D.E. (1975)
 «Plant propagation. Principles and practices»
Prentice-Hall Inc., New-Jersey, USA
- JONARD R., HUGARD J., MACHEIX J.J., MARTINEZ J., MOSELLA-CHANCEL L., POESSEL J.L., VILLEMUR P. (1983)
 «*In vitro* micrografting and its applications to fruit science»
Scientia Horticulturae 20, 147-159
- LACHAUD S. (1966)
 «Étude de l'incompatibilité chez des autogreffes et des homogreffes de haricot (*Phaseolus vulgaris nanus*), en fonction de l'âge des plantes greffées»
Revue générale de botanique, 73, 773-782
- LACHAUD S. (1975)
 «Incompatibilité des greffes et vieillissement chez les végétaux»
Ann. Biol. 14, 98-128
- MISSON J.P., GIOT-WIRGOT P. (1985)
 «Rajeunissement d'un clone de thuya en vue de sa multiplication *in vitro*»
Annales Afocel, 1984, 187-197
- MONTEUUIS O. (1985)
 «La multiplication végétative du séquoia géant en vue du clonage»
Annales Afocel 1984, 139-171

- MONTEUUIS O. (1986)
« Microgreffage de points végétatifs de *Sequoiadendron giganteum* Buchholz séculaires sur de jeunes semis cultivés *in vitro* »
C.R. Acad. Sc., 302, 223-225
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962)
« A revised medium for rapid growth of bioassays with tobacco tissue cultures »
Physiol. plant, 15, 473-497
- MURASHIGE T., BITTERS W.P., RANGAN T.S., NAUER E.M., ROISTACHER C.N., HOLLIDAY P.B. (1972)
« A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones »
Hortscience, 7, 118-119
- MURASHIGE T. (1985)
« *In vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants »
Symposium 16-20 septembre 1985, Gembloux, Belgique
- MURASHIGE T. (1986)
« Pour une amélioration des procédés de culture *in vitro* de tissus végétaux »
Biofutur, 46, 19-20
- NAVARRO L., ROISTACHER C.N., MURASHIGE T. (1975)
« Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. »
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100, 471-479
- NOZERAN R. (1978)
« Réflexions sur les enchaînements de fonctionnement au cours du cycle des végétaux supérieurs »
Bull. Soc. bot. Fr., 125, 263-280
- NOZERAN R., DUCREUX G., ROSSIGNOL-BANCILHON L. (1982)
« Réflexions sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux »
Bull. Soc. bot. Fr., 129, 107-130
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P. (1977)
« Études de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* »
Acta Horticulturae, 78, 437-442
- RANCILLAC M., FAYE M., DAVID A. (1982)
« *In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster* »
Physiol. plant., 56, 97-101
- SHIMOMURA T., FUZIHARA K., (1977)
« Physiological study of graft union formation in cactus »
J. Japan. Soc. Hort. Sci., 45, 397-406
- TRAN VAN H., DAVID A. (1985)
« Greffage *in vitro* du pin maritime »
Can. J. Bot., 63, 1017-1020
- WAREING F. (1980)
« Root hormones and shoot growth »
In : Control of shoot growth in trees, Proc. IUFRO Workshop Frederickton, N.B., Canada, 237-256
- WATELET-GONOD M.C., FAVRE J.M. (1981)
« Miniaturisation et rajeunissement chez *Dablia variabilis* (variété Télévision) cultivé *in vitro* »
Ann. Sc. Nat., Bot., Paris, 13^{ème} série, 2 et 3, 51-67

RÉSUMÉ

Différents aspects du microgreffage de *Sequoiadendron giganteum* sont analysés. La mise au point d'une technique détaillée permet de greffer des méristèmes d'individus centenaires sur de jeunes semis cultivés *in vitro*. Les résultats obtenus sont discutés en relation avec les phénomènes de rajeunissement. La technique proposée paraît applicable à de nombreux secteurs de la biologie, aussi bien en recherche fondamentale que dans des domaines plus appliqués.



SUMMARY

Title of the article : « Micrografting of giant sequoia »

Different aspects of the micrografting in *Sequoiadendron giganteum* are analysed. The development of a detailed technique permits the grafting of meristems from 100-years-old trees on young seedlings cultured *in vitro*. The results are discussed with regard to the phenomenon of rejuvenation. The proposed technique seems applicable to a great number of biological sectors as well to fundamental as to more practical research.



ZUSAMMENFASSUNG

Titel des Artikels : « Mikroveredelung bei *Sequoiadendron giganteum* ».

In diesem Artikel werden verschiedene Gesichtspunkte der Mikroveredelung des Mammutbaumes analysiert. Die Entwicklung einer eingehend beschriebenen Methode ermöglicht das Pfropfen von Meristemen hundertjähriger Bäume auf junge *in vitro* produzierte Sämlinge. Die Ergebnisse werden in Verbindung mit dem Phänomen der Verjüngung besprochen. Die vorgeschlagene Technik scheint in zahlreichen biologischen Bereichen anwendbar zu sein, sei es in der Grundlagenforschung sowie in praktischen Anwendungsbereichen.



